Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019340

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP

Number: 2003-435943

Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in

compliance with Rule 17.1(a) or (b)



許 庁 日 JAPAN PATENT OFFICE

24.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:

2003年12月26日

願 番 出 Application Number: 特願2003-435943

[ST. 10/C]:

[JP2003-435943]

出 願 人 Applicant(s):

プリマハム株式会社

独立行政法人食品総合研究所

特許庁長官

Commissioner, Japan Patent Office

2月18日 2005年







【書類名】 特許願 2003P1920 【整理番号】 平成15年12月26日 【提出日】 特許庁長官 殿 【あて先】 【国際特許分類】 C12Q 1/68 【発明者】 茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内 【住所又は居所】 堀越 菜穂子 【氏名】 【発明者】 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人食品総合研究 【住所又は居所】 所内 川崎 晋 【氏名】 【発明者】 茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内 【住所又は居所】 岡田 幸男 【氏名】 【発明者】 茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内 【住所又は居所】 竹下 和子 【氏名】 【発明者】 プリマハム株式会社内 茨城県土浦市中向原635番地 【住所又は居所】 鮫島 隆 【氏名】 【発明者】 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人食品総合研究 【住所又は居所】 所内 川本 伸一 【氏名】 【発明者】 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人食品総合研究 【住所又は居所】 所内 一色 賢司 【氏名】 【特許出願人】 000113067 【識別番号】 プリマハム株式会社 【氏名又は名称】 貴納 順二 【代表者】 【特許出願人】 501407218 【識別番号】 独立行政法人食品総合研究所 【氏名又は名称】 鈴木 建夫 【代表者】 【代理人】 100107984 【識別番号】 【弁理士】 廣田 雅紀 【氏名又は名称】 【選任した代理人】 100102255 【識別番号】 【弁理士】 小澤 誠次 【氏名又は名称】 【選任した代理人】 【識別番号】 100118957 【弁理士】

岡 晴子

【氏名又は名称】



【選任した代理人】

【識別番号】 100123168

【弁理士】

【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子

【選任した代理人】

【識別番号】

100120086

【弁理士】

【氏名又は名称】

▲高▼津 一也

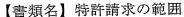
【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】明細書 1【物件名】図面 1【物件名】要約書 1【包括委任状番号】9701840



【請求項1】

食品中の2種以上の異なる特性の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝 子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出す る方法であって、

- (A) 1 C F U / 1 0 0 g の微生物が 2 4 時間培養後に 1 0 3 C F U / m 1 以上となる培 養条件下で培養する工程と、
- (B) 少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検 出対象微生物のDNAを抽出する工程と、
- (C) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工 程と

を含むことを特徴とする微生物の多重検出方法。

【請求項2】

2種以上の異なる特性の微生物が、リステリアモノサイトゲネスを含むことを特徴とする 請求項1記載の微生物の多重検出方法。

【請求項3】

特異的なプライマーが、配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーである ことを特徴とする請求項2記載の微生物の多重検出方法。

【請求項4】

2種以上の異なる特性の微生物が、病原性大腸菌〇157を含むことを特徴とする請求項 1 記載の微生物の多重検出方法。

【請求項5】

特異的なプライマーが、配列番号1及び2に示される塩基配列からなるプライマーである ことを特徴とする請求項4記載の微生物の多重検出方法。

2種以上の異なる特性の微生物が、サルモネラ属菌を含むことを特徴とする請求項1記載 の微生物の多重検出方法。

【請求項7】

特異的なプライマーが、配列番号3及び4に示される塩基配列からなるプライマーである ことを特徴とする請求項6記載の微生物の多重検出方法。

【請求項8】

培養後のpHが5.1以上となる培養条件下で培養することを特徴とする請求項1~7の いずれか記載の微生物の多重検出方法。

【請求項9】

グルコース濃度が0.15%以下の培地、及び/又は、リン酸緩衝液の濃度が50mM以 上若しくはそれと同等の緩衝能を有する培地で培養することを特徴とする請求項1~8の いずれか記載の微生物の多重検出方法。

【請求項10】

溶菌酵素を作用させた後、界面活性剤とタンパク質変性剤で処理し、遠心分離により不溶 画分を取り除き、アルコール沈殿によりDNAを析出して抽出することを特徴とする請求 項1~9のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

【請求項11】

溶菌酵素が、アクロモペプチダーゼ及び/又はリゾチームであることを特徴とする請求項 1~10のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

【請求項12】

界面活性剤が、ソルビタンモノラウラートのエチレンオキシド縮合物であることを特徴と する請求項1~11のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

【請求項13】

タンパク質変性剤が、グアニジンイソチオシアネートであることを特徴とする請求項1~ 12のいずれか記載の微生物の多重検出方法。



特異的なプライマーを各120 n M以下の濃度で組み合わせてマルチプレックス P C R を行うことを特徴とする請求項 $1\sim13$ のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

【請求項15】

食品が、食肉又は食肉加工品であることを特徴とする請求項1~14のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】微生物の多重検出方法

【技術分野】

[0001]

本発明は、食品に存在する病原性大腸菌 0 1 5 7、リステリアモノサイトゲネス、サル モネラ属菌等の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、 それを解析することで、公定法と同等又はそれ以上の高い感度で検出することができる微 生物の多重検出方法に関する。

【背景技術】

$[0\ 0\ 0\ 2]$

従来、マルチプレックスPCRを利用する微生物の多重検出方法は、よく知られている 。例えば、野菜・果実を対象として病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリア モノサイトゲネスの各菌を多重検出する方法 (例えば、非特許文献 1 参照) 、食品中の病 原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌を多重検出する方法(例えば、非特許文献2参照) 、牛乳を対象として病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネ ス、カンピロバクター属菌の各菌を多重検出する方法(例えば、非特許文献3参照)、食 品中のサルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを多重検出する方法(例えば、非特 許文献4参照)、食品中の病原性大腸菌〇157等の大腸菌を多重検出する方法(例えば 、非特許文献5参照)、牛乳を対象として病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リス テリアモノサイトゲネスの各菌を多重検出する方法(例えば、非特許文献6参照)などが 報告されている。また、マルチプレックスPCR用のプライマーとして、大腸菌の検出用 プライマー (例えば、特許文献1参照)、病原性大腸菌〇157の〇抗原検出用プライマ - (例えば、特許文献2参照)も知られている。

[0003]

他方、微生物のDNAを抽出する方法として、結核菌等のマイコバクテリウムに溶菌酵 素アクロモペプチダーゼ等を用いる方法(例えば、特許文献3参照)、グラム陰性、陽性 菌に溶菌酵素アクロモペプチダーゼ等を用いる方法(例えば、特許文献4参照)、レジオ ネラ菌にプロテアーゼKやアクロモペプチダーゼ等を用いる方法(例えば、特許文献5参 照)、大腸菌等にタンパク変性剤、還元剤、界面活性剤、キレート剤等を用いる方法(例 えば、特許文献6参照)などが知られている。

【特許文献1】特開2001-95576号公報

【特許文献2】特開平11-332599号公報

【特許文献3】特開平6-165676号公報

【特許文献4】特表平9-500793号公報

【特許文献5】特開平5-317033号公報

【特許文献6】特開平6-289016号公報

【非特許文献 1 】 Japanese Journal of Food Microbiology, Vol.19, No2, 47-55, 2 002

【非特許文献 2】 Journal of Industrial Microbiology, & Biotechnology, 21, 92-

【非特許文献 3】 Milchwissenschaft, 55 (9), 500-503, 2000

【非特許文献 4】 Journal of Food Protection, Vol.64, Noll, 1744-1750, 2001

【非特許文献 5】 Molecular and Cellular Probes, 13, 291-302, 1999

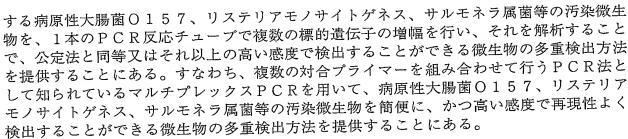
【非特許文献 6】 Food Microbiology, 20, 345-350, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0004]

1種類の微生物をPCR法によって検出する方法は既に確立されているが、複数の微生 物をPCR法で同時に検出する方法は、食品分野で検討されつつあるものの、未だ十分に 信頼できる方法は確立されていないというのが現状である。本発明の課題は、食品に存在



【課題を解決するための手段】

[0005]

(培養)

危害の高い病原菌は、食品中で「陰性」(25g中に含まれていないこと)であること が定められており、その検出には、公定法と同等以上の精度が求められる。食品25g中 1 C F U レベルの微量に汚染した微生物を検出するためには、増菌培養が不可欠である。 増菌培養する場合、通常、対象の病原菌ごとに個別に選択性のある培地を使用して培養す るが、同時に数種の微生物を検出するために、増菌についても、1種の培地で複数の微生 物を同時に増殖させるための検討を行った。なるべく短時間(24時間以内)で検出でき る培養条件を設定する必要があり、そのためには、特に培地の選択が重要となる。同時に 増菌することは、対象微生物同士が同科あるいは同属菌種、または発育特性が似ていれば 比較的容易であるが、異種で発育特性が異なる微生物の場合は難しい。例えば、病原性大 腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを検出対象とした場合、 これら病原菌3菌種中で、サルモネラ、O157に比べて、低温発育性であるリステリア は増殖が遅いという問題があった。

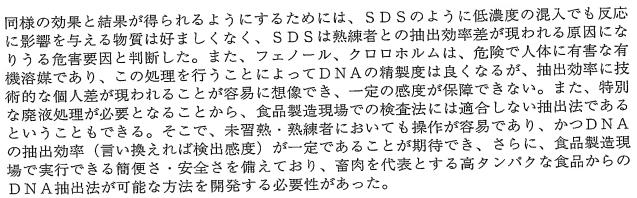
[0006]

そこで、他の細菌が混在した中でも、特にリステリアが十分に増殖できるように、リス テリアにとって好ましい栄養源を持つ培地で、炭水化物が少なく、緩衝能が高い培地につ いて検討したところ、培地No.17(トリプトン5g、プロテオースペプトン5g、塩 化ナトリウム5g、グルコース0.5g、リン酸ニナトリウム7g、リン酸ーカリウム1 5g/1L中)は、トリプトソーヤブイヨンやBHI(ブレインハートインフュージョン)、BPW(Buffered peptone Water)よりも3種混在中でリステリアの増殖が最も良く 、サルモネラと〇157もリステリアより増殖が早かった。このことから、3種同時に検 出するためには培地No. 17が良いと考えられた。

(DNA)

PCR反応を行う際、DNAの抽出を行うが、DNAの抽出では溶菌操作が必要となる 。グラム陽性細菌の溶解は、より厚くより高密度なペプチドグリカン層が主要細菌細胞壁 成分であるため、グラム陰性細菌よりもかなり困難である。今回の技術ではサルモネラ、 O157などのグラム陰性菌に加え、リステリアというグラム陽性菌も同時に検出する、 という点で困難であった。また、食品からの抽出という点では、食品残渣は多様性なもの であり、溶菌法を1種類に特定するのは困難である。特に畜肉などに代表される検体では 高タンパク、高脂肪、かつ個体差があるので、細菌の溶菌が一定の効率で行われないとい う、DNA抽出の上での困難性が存在した。さらに検討したところ、トリプトソーヤブイ ヨン、ミューラーヒントンブロスなど、培養する培地の違いによって、リゾチームだけで は細胞が壊れない (=DNAが抽出できない) リステリアがあった。培養条件は、たとえ 同じ培地を使用しても食品の種類が異なったり、損傷程度が異なることで変わってくると 考えられる。また、場合によっては、より回復の良い培地を用いる必要性があるため、ど のような場合でも細胞が壊れる抽出方法が必要であった。

一般的なDNA抽出法として、ボイル法やアルカリーSDS法が知られているが、ボイ ル法ではリステリアが高感度に抽出できないことを確認した。SDSは、DNA抽出にお いて使用しやすい界面活性剤として知られているが、強力なPCR阻害剤であるため、抽 出に用いた後には、完全に除去しなければならない。未習熟な実験者においても熟練者と



[0008]

培養液を5μmのフィルターを通すことで大きな食品くずを取り除き、その後溶菌酵素 液 (アクロモペプチターゼとリゾチームの混合液) を混合し、37℃で1時間処理後、界 面活性剤 [ツィーン20 (Tween20)] とタンパク質変性剤 (グアニジンイソチオシア ネート) の混合液を加えて完全に菌体を溶解できることがわかった。遠心分離により不溶 画分を取り除き、アルコール沈殿を行いDNAを抽出した。処理の順番はアクロモペプチ ターゼがリゾチームより先、もしくは一緒に行い、その後ツィーン20処理後、グアニジ ンイソチオシアネート処理、もしくはツィーン20とグアニジンイソチオシアネート処理 を一緒に行う必要があった。ツィーン20は粘性が高く、単独で加えることが難しいため 混合添加することが望ましいこともわかった。

[0009]

また、フェノール、クロロホルム処理を行わなくても、アルコール沈殿やDNA抽出液 添加量(PCR反応液 50μ 1に対し 2μ 1)によって、PCRで問題なく検出できる程 度に可溶化したタンパク質を除くことができた。ツィーン20はPCR反応液にも使われ るもので、SDSに比べ阻害が少なく、未習熟な実験者でも扱いが容易であると考えられ た。また、もちろん、この抽出法はおのおの単独菌種での抽出においても可能である。さ らに、(1)アクロモペプチターゼ単独、(2)リゾチーム単独、(3)アクロモペプチ ターゼ処理後グアニジンイソチオシアネート+ツィーン 2 0 処理、(4) リゾチーム処理 後グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、(5)プロテイナーゼK、(6) プロテイナーゼK処理後グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、(7)グア ニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、(8)グアニジンイソチオシアネート+ ツィーン20処理+加熱処理、の各方法についても試みたが、いずれも前記処理ほどリス テリアを高感度に抽出できなかった。

(PCR反応)

数種の菌を同時に検出する方法としてマルチプレックスPCRを採用した。複数の対合 プライマーを組み合わせて行うPCR法であるマルチプレックスPCR法には、互いにプ ライマーダイマーを生成したり、識別バンドが互いに干渉したり、重複したりすることが なく、融解温度の近い対合プライマーを選定して用いた。プライマーの選択や混合割合に より、反応のしやすさ、検出限界に差が出てくることもわかった。マルチプレックスPC Rを行う場合には、その後の判定に用いる電気泳動像に3菌種のバンドが同じような濃さ で検出するようにプライマーの混合割合を調整する必要がある。3菌種が同じDNA濃度 (20pg)のとき、3種菌のバンドが同様の濃さで検出できるよう、調整した。6種の プライマーの混合割合はサルモネラ 120 nM、リステリア 100 nM、〇157 8 0 n Mが最も理想的な配合量であった。さらに低濃度の混合割合である、サルモネラ 3 0 n M、リステリア 25 n M、O 157 20 n M においても検討したが、電気泳動によ る目視での検出が可能ではあるが困難であったことから、上記濃度が好ましいことがわか った。

[0010]

また、PCR反応では、最終産生量が10-8M程度まで標的遺伝子を増幅できることが 知られている。PCR反応では通常200nM程度のプライマーを加えて行うが、このプ ライマー量は明らかに過剰であることがわかった。特にマルチプレックス反応の場合、その過剰なプライマーによる生成産物(これは非標的産物を含む)により優位な反応のみが結果として得られる可能性が高い。このため、PCR反応においてプライマー量を制限することで最終産物量を制限することとマルチプレックス反応との関係を考慮した。もちろん、PCR反応にはプライマーダイマーなどを代表とする非増幅産物もプライマーを消費するため、下限の濃度は存在するが、検出器の感度最低限のプライマー濃度を設定することにより、より複数のマルチプレックス反応を成功させる可能性が期待できることもわかった。言い換えれば、プライマーの下限の濃度を検出器の感度に合わせることと、より複数の検出が期待できる。電気泳動や蛍光プローブ法、キャピラリー電気泳動法などによる検出器の限界を考慮した上で、100nM程度での反応を行わざるを得ず、3種類の病に関の検出を確認したが、検出器の感度上昇によってこの濃度を低く設定することができ、より多くの標的を一度に検出できると考えられる。より高感度な増幅産物検出法が実現した際には上記の考えを踏まえた上で最終産物量を制御することにより、より多数のマルチプレックスPCRによる多重同時検出を実現できることもわかった。

[0011]

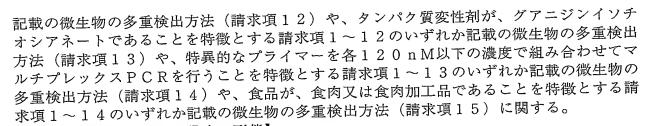
本発明によると、食品に存在する病原性大腸菌〇157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等又はそれ以上の高い感度で簡便に検出することができる。

[0012]

すなわち本発明は、食品中の2種以上の異なる特性の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する方法であって、

- (A) 1 C F U / 1 0 0 g の微生物が 2 4 時間培養後に 1 0 ³ C F U / m 1 以上となる培養条件下で培養する工程と、
- (B) 少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検 出対象微生物のDNAを抽出する工程と、
- (C) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程と

を含むことを特徴とする微生物の多重検出方法(請求項1)や、2種以上の異なる特性の 微生物が、リステリアモノサイトゲネスを含むことを特徴とする請求項1記載の微生物の 多重検出方法(請求項2)や、特異的なプライマーが、配列番号5及び6に示される塩基 配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項2記載の微生物の多重検出方法(請求項3)や、2種以上の異なる特性の微生物が、病原性大腸菌〇157を含むことを特 徴とする請求項1記載の微生物の多重検出方法(請求項4)や、特異的なプライマーが、 配列番号1及び2に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項 4記載の微生物の多重検出方法(請求項5)や、2種以上の異なる特性の微生物が、サル モネラ属菌を含むことを特徴とする請求項1記載の微生物の多重検出方法(請求項6)や 、特異的なプライマーが、配列番号3及び4に示される塩基配列からなるプライマーであ ることを特徴とする請求項6記載の微生物の多重検出方法(請求項7)や、培養後のpH が 5. 1以上となる培養条件下で培養することを特徴とする請求項 1~7のいずれか記載 の微生物の多重検出方法(請求項8)や、グルコース濃度が0.15%以下の培地、及び /又は、リン酸緩衝液の濃度が50mM以上若しくはそれと同等の緩衝能を有する培地で 培養することを特徴とする請求項1~8のいずれか記載の微生物の多重検出方法(請求項 9) や、溶菌酵素を作用させた後、界面活性剤とタンパク質変性剤で処理し、遠心分離に より不溶画分を取り除き、アルコール沈殿によりDNAを析出して抽出することを特徴と する請求項1~9のいずれか記載の微生物の多重検出方法(請求項10)や、溶菌酵素が 、アクロモペプチダーゼ及び/又はリゾチームであることを特徴とする請求項1~10の いずれか記載の微生物の多重検出方法(請求項11)や、界面活性剤が、ソルビタンモノ ラウラートのエチレンオキシド縮合物であることを特徴とする請求項1~11のいずれか



【発明を実施するための最良の形態】

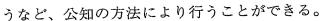
[0013] 本発明の微生物の多重検出方法としては、食肉、食肉加工品、牛乳、野菜等の食品中の 2種以上の異なる特性の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅 を行い、それを解析することで公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する方法で あって、(A) 1 C F U / 1 0 0 g の微生物が 2 4 時間培養後に 1 0 ³ C F U / m 1 以上 となる培養条件下で培養する工程と、(B)少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパ ク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のDNAを抽出する工程と、(C)検 出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程とを含 む方法であれば特に制限されず、検出対象の微生物としては、食品の汚染微生物であれば どのようなものでもよく、リステリアモノサイトゲネス、病原性大腸菌〇157、サルモ ネラ属菌、カンピロバクター属菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、エルシニア属菌、大 腸菌群、セレウス菌、コレラ菌、赤痢菌、ボツリヌス菌などを具体的に例示することがで きる。また、公定法とは、「食品衛生検査指針」(1990年 社団法人 日本食品衛生 協会)に説明されている方法をいい、具体例が実施例9において説明されている。

[0014]

本発明の微生物の多重検出方法によると、食品25g中1CFUレベルの微量に汚染し た微生物を検出することが可能となるが、本発明の微生物の多重検出方法においては、食 品汚染微生物の培養工程が必須とされる。食品汚染微生物の増菌培養における培養条件と しては、1CFU/100gの微生物が24時間培養後に10³CFU/ml以上となる 培養条件であれば特に制限されないが、緩衝能を有する培地を用いて培養後のpHが5. 1以上となる培養条件下で培養することや、グルコース濃度が0.15%以下の培地、及 び/又は、リン酸緩衝液の濃度が50mM以上若しくはそれと同等の緩衝能を有する培地 で培養するのが好ましい。リン酸緩衝液以外の緩衝液としては、クエン緩衝液、酢酸緩衝 液、乳酸緩衝液、酒石酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、トリス緩衝液、MOPS緩衝液、ME S緩衝液等を挙げることができる。

[0015]

本発明の微生物の多重検出方法においては、培養増殖させた食品汚染微生物からのDN A抽出工程が必須とされる。かかるDNA抽出工程としては、少なくとも、溶菌酵素と界 面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のDNAを抽出する 工程であれば特に制限されないが、溶菌酵素を作用させた後、界面活性剤とタンパク質変 性剤で処理し、遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿によりDNAを析出 して抽出する方法を好適に例示することができる。上記溶菌酵素としては、アクロモペプ チダーゼ、リゾチーム、プロテアーゼK、キトサナーゼ、キチナーゼ、eta-1,3-グル カナーゼ、ザイモリアーゼ、セルラーゼ等を挙げることができ、これらは1種又は2種以 上用いることができるが、中でもアクロモペプチダーゼ及び/又はリゾチームを用いるこ とができる。上記界面活性剤としては、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性 界面活性剤、非イオン界面活性剤を挙げることができ、中でも非イオン界面活性剤である ソルビタンモノラウラートのエチレンオキシド縮合物、より具体的には、ツィーン20を 好適に挙げることができる。上記タンパク質変性剤としては、グアニジンイソチオシアネ ート、尿素、塩酸グアニジン、トリクロロ酢酸、SDS、Triton X-100、デ オキシコール酸等を挙げることができ、これらは1種又は2種以上用いることができるが 、中でも溶菌効果や取扱い易さの点でグアニジンイソチオシアネートが好ましい。溶菌物 からのDNAの抽出・析出は、遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿を行



[0016]

本発明の微生物の多重検出方法においては、前記抽出したDNAと、検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程が必須とされる。使用するプライマーとしては、検出対象微生物特異的なプライマーであって、互いにプライマーを生成したり、識別バンドが互いに干渉したり、重複したりすることがなく、融解温度の近い対合プライマーを選択することが好ましい。また、その後の判定に用いる電気泳動像に出現するバンドが同じような濃さで検出しうるようにプライマーの混合割合を調整することが好ましい。例えば、病原性大腸菌O157に特異的なプライマーの混合としては、配列番号3及び4に示される塩基配列からなるプライマーが、リステリアモノサイトゲネスに特異的なプライマーとしては、配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーが好ましく、この場合、合計600nM以下の濃度でプライマーを混合することが好ましく、また6種のプライマーの混合割合はサルモネラ120nM、リステリア 100nM、O157 80nMが最も好ましい。

[0017]

PCR後の検出法としては、電気泳動法、蛍光プローブ法、キャピラリー電気泳動法、 定量PCR法などにより行うこともできる

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの 例示に限定されるものではない。

【実施例1】

[0018]

(既存培地での同時培養)

病原性大腸菌 O 1 5 7 はEscherichia coli O 1 5 7: H 7 A T C C 4 3 8 9 4、サルモネラ属菌はSalmonella Enteritidis I F O 3 3 1 3、リステリアモノサイトゲネスはListeria monocytogenes A T C C 4 9 5 9 4 を用いた。また、肉由来菌には、シュードモナス (Pseudomonas fragi)、シトロバクター (Citrobacter freundii)、ラクトバチルス (Lactobacillus viridescens)、ロイコノストック (Leuconostoc mesenteroides)の4株を用いた。試験培地にはトリプトソーヤブイヨン (T S B; 日水製薬社製)、及び、Buffered Peptone

Water (BPW;ペプトン10g、塩化ナトリウム5g、リン酸一水素ナトリウム3.5g、リン酸ニ水素カリウム1.5g/1L) の2つの培地を用いた。

[0019]

病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを各1CFU/ 100m1、肉由来菌を各 10^4 СFU/100m1 になるように試験培地に接種した。 35 ℃で培養し、経時的に一般生菌数、〇157数、サルモネラ数、リステリア数を計測した。一般生菌数は標準寒天培地(日水製薬社製)

を用い、35℃で48時間培養後の総コロニー数、O157数はデソキシコレート寒天培 地(日水製薬社製)を用い、35℃で24時間培養後の大腸菌様のコ

ロニー数、サルモネラ数はMLCB寒天培地(日水製薬社製)を用い、35℃

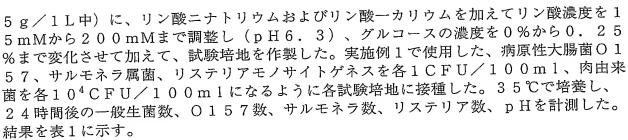
で24時間培養後のサルモネラ様のコロニー数、リステリア数はPALCAM寒天培地(Merck社製)を用い、35℃で48時間培養後のリステリア様のコロニー数をそれぞれ測定した。結果を図1に示す。その結果、いずれの培地でも特にリステリアモノサイトゲネスの増殖が弱かった。培養液のpHを測定したところ、pHの低下が認められた。

【実施例2】

[0020]

(培地の緩衝能および糖濃度の影響)

実施例1でリステリアモノサイトゲネスの増殖が弱かったのは培養後の培地のpHが低下したことが原因と考えられたため、各菌の増殖に及ぼす培地の緩衝能および糖濃度の影響を調査した。基本培地(トリプトン5g、プロテオースペプトン5g、塩化ナトリウム



[0021]

その結果、グルコース濃度 0. 15%以下の培地、またはリン酸濃度 50mM以上の培地、または培養後の p H を 5. 1以上に保持する培地を用いることによって病原性大腸菌 O 157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスとも 24時間培養で 10°C F U/m l 以上(P C R での検出に必要な菌数)に増殖した。以降の試験には表 1のN o. 17の培地(トリプトン5g、プロテオースペプトン5g、塩化ナトリウム5g、グルコース 0. 5g、リン酸ニナトリウム7g、リン酸ーカリウム 15g/1L中)を選定した。培地成分については、検出の目的とする細菌の存在環境や損傷程度に応じて、トリプトン、プロテオースペプトン以外の窒素源、グルコース以外の炭素源、リン酸以外の緩衝能を持つ物質も有効であり、また、増殖を促進する物質として無機塩類やピルビン酸もしくはピルビン酸塩、ツィーンなどの界面活性剤を添加した方がより好ましかった。

【0022】 【表1】

								
No.	リン酸濃 度(mM)	グルコー ス濃度 (%)	一般生菌 数 (CFU/ml)	0157数 (CFU/ml)	サルモネ ラ数 (CFU/ml)	リステリ ア数 (CFU/ml)	На	適用
	15	0	2.4×10 ⁸	1.4×10 ⁷	6.2×10 ⁶	2.0×10 ⁶	5.99	可
1		0.5	1.6×10 ⁸	1.1×10^7	5.6×10 ⁶	1.5×10 ⁶	5.97	可
2	ł	1.0	3.0×10^{8}	5.7×10 ⁶	4.3×10 ⁶	4.7×10 ⁶	5.62	可
3	-	1.5	2.8×10^{8}	1.4×10 ⁵	3.0×10 ⁵	3.0×10 ⁴	5.11	可
4	4	2.0	$\frac{2.0 \times 10^8}{3.2 \times 10^8}$	5. 1×10 ⁴	9.1×10 ²	6.1×10 ²	4.79	不可
5	-	2.5	3.9×10^8	2.3×10 ⁴	1.2×10 ³	10	4.58	不可
-	 	0	2.1×10^{8}	3.2×10^7	5.1×10 ⁶	6.2×10 ⁶	6.13	可
-	4	0.5	1.8×10 ⁸	2.7×10^{7}	4.9×10 ⁶	5.9×10 ⁶	6.10	可
-	8	1.0	4.4×10^{8}	2.0×10^{7}	4.8×10 ⁶	3.0×10 ⁶	5.94	可
-	9	1.5	3.1×10^{8}	4.3×10 ⁶	7.1×10^{6}	1.6×10 ⁶	5.71	可
1	-	2.0	6.8×10^{8}	4.8×10 ⁵	2.4×10 ⁴	6.9×10^3	5.40	可
-	$\frac{1}{2}$	2.5	5.7×10 ⁸	4.7×10 ⁵	1.6×10 ⁴	3.0×10^{2}	5.03	不可
-		0.5	1.1×10 ⁸	2.4×10^{7}	5.2×10 ⁶	6.1×10 ⁶	6.12	可
-	50	2.5	3.9×10^{8}	1.1×10 ⁷	5.0×10 ⁴	3.4×10^4	5.62	可
<u> </u>		0.5	3.2×10^{8}	2.5×10^7	5.1×10 ⁶	5.2×10 ⁶	6.10	可
_	15) 100 16	2.5	6.2×10^{8}	2.0×10^7	4.2×10 ⁶	4.5×10 ⁶	6.02	可
<u> </u>		0.5	4.4×10^{8}		5.4×10 ⁶	5.8×10 ⁶	6.17	可
-	17 150 18	2.5	9.5×10^{7}			8.0×10^6	6.22	可
	-01	0.5	1.2×10^{8}		5.1×10	5.8×10^6	6.17	可
	19 200	2.5	8.4×10 ³		6.8×10	9.0×10 ⁶	6.15	可
L	40	2.0			_1			



[0023]

(DNA抽出方法1)

病原性大腸菌 O 1 5 7、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌をNo. 1 7 培地 1 0 m 1 に接種し、3 5 $\mathbb C$ で 2 4 時間培養した。各培養液をそれぞれ 1 m 1 チューブに取り、1 5,0 0 0 r. p. mで 5 分間遠心分離を行い、菌体を回収した。その菌体回収物に溶菌酵素液 $\{20\,\mathrm{mg/m1}\,\mathrm{or}\,\mathrm{op}\,\mathrm{de}\,\mathrm{ce}\,\mathrm{de$

【実施例4】

[0024]

(DNA抽出方法2)

同様に、病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌 をNo. 17培地10mlに接種し、35℃で24時間培養した。各培養液をそれぞれ1 mlチューブに取り、15,000r.p.mで5分間遠心分離を行い、菌体を回収した 。その菌体回収物に溶菌剤(ツィーン20を1~2%添加した4Mグアニジンイソチオシ アネート溶液)を500µ1加え、回収物を溶解した。100℃で10分間加熱し、5分 間氷冷した。この溶液を光学顕微鏡で観察したところ、病原性大腸菌〇157やサルモネ ラ属菌は溶菌できていたが、実施例3のDNA抽出方法に比べるとリステリアモノサイト ゲネスの溶菌の程度が少し劣っていた。また、リステリアモノサイトゲネスの溶菌を、1) 菌体回収物に20mg/m1のアクロモペプチダーゼ10μ1とTEバッファー190μ 1の混合液を加え、37℃で1時間処理した液、2)菌体回収物に20mg/m1のリゾチ 3)上記1)液に、溶菌剤 (ツィーン20を1~2%添加した4Mグアニジンイソチオシアネ ート溶液)を 300μ 1加え混合した液、4)上記2)液に、溶菌剤(ツィーン20を1~2%添加した 4 Mグアニジンイソチオシアネート溶液)を 3 0 0 μ 1 加え混合した液、5)菌 体回収物に20mg/m1のプロテイナーゼK1μ1とTEバッファー200μ1の混合 液を加え、37℃で1時間処理した液、6)上記5)液に、溶菌剤(ツィーン20を1~2% 添加した4 Mグアニジンイソチオシアネート溶液)を300μ1加え混合した液をそれぞ れ用いて行い、光学顕微鏡で観察を行ったが、いずれもリステリアモノサイトゲネスの溶 菌の程度が実施例3のDNA抽出方法に比べると少し劣っていた。

【実施例5】

[0025]

(PCR反応の条件設定)

実施例3で得たDNA抽出液を用いてPCR反応を行った。PCRは、次のプライマーを用いた。

配列番号 1:GGC GGA TTA GAC TTC GGC TA

配列番号 2 : CGT TTT GGC ACT ATT TGC CC

配列番号 3 : GGG AGT CCA GGT TGA CGG AAA ATT T配列番号 4 : GTC ACG GAA GAA GAG AAA TCC GTA CG

配列番号 5 : CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG 配列番号 6 : CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT

PCR反応液は、 $10\times Buffer5\mu l$ 、 $dNTP溶液4\mu l$ 、 $UNG0.5\mu l$ 、AmpliTaq Gold 0. $25\mu l$ 、MgCl2 $10\mu l$ (いずれも、アプライドバイオシステムズジャパン社製)、プライマー、DN



【実施例6】

[0026]

(反応特異性の確認)

表 2 に示した病原性大腸菌 O 1 5 7 e 4 e 株、サルモネラ属菌 4 株、リステリアモノサイトゲネス 1 0 株、病原性大腸菌 O 1 5 7 以外のEscherichia coli 4 株、リステリアモノサイトゲネス以外のリステリア属 4 株を用いて特異性の確認を行った。各菌株をトリプトソーヤブイヨン(日水製薬社製)で 3 5 e e e e 4 時間培

養し、実施例3記載のDNA抽出および実施例5記載のPCR反応を行った。PCR反応の結果を2.5%アガロースゲル電気泳動で確認したところ、病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスでは電気泳動像の所定の位置にバンドが検出し、陽性であることが示された。一方、病原性大腸菌〇157以外のEscherichia coli、リステリアモノサイトゲネス以外のリステリア属では、バンドが検出せず、陰性菌であることが示され、特異性に問題がないことを確認した。結果を表2に示した。

[0027]

【表2】

菌株名	結果
1-1 Escherichia coli)157:H7 陽性
1-2 Escherichia coli	0157:H7 陽性
1-3 Escherichia coli	0157:H7 陽性
1-4 Escherichia coli	0157:H7 陽性
2-1 Salmonella Typhim	urium 陽性
2-2 Salmonella Enteri	tidis 陽性
2-3 Salmonella Enteri	tidis 陽性
2-4 Salmonella sp.	陽性 _
3-1 Listeria monocyto	genes 陽性
3-2 Listeria monocyto	ngenes 陽性
3-3 Listeria monocyto	ngenes 陽性
3-4 Listeria monocyte	
3-5 Listeria monocyt	ogenes 陽性
3-6 Listeria monocyt	
3-7 Listeria monocyt	total tail
3-8 Listeria monocyt	ogenes 陽性
3-9 Listeria monocyt	
3-10 Listeria monocyt	pate 1 of
4-1 Escherichia coli	
4-2 Escherichia coli	
4-3 Escherichia coli	
4-4 Escherichia coli	1al
5-1 Listeria welshin	
5-2 Listeria innouci	PA U.
5-3 Listeria ivanov.	200 14
5-4 Listeria seelig	PIA LIE



[0028]

(肉成分混在系での検出限界の確認)

病原性大腸菌〇157:H7 ATCC43894、サルモネラ属菌IFO3313、リステリアモノサイトゲネスATCC49594を用いた。各菌を前記No.17培地10mlに接種し、35℃で24時間培養を行い、菌株培養液を得た。また、鶏もも挽肉25gにNo.17培地225mlを加え、30秒間ストマッカーで粉砕し、35℃で24時間培養した。この時の培養液の一般生菌数は3.1×10 8 С F U / m 1 であった。鶏もも挽肉の培養液を9m1ずつ分注し、これに各菌株培養液の10倍段階希釈液1mlをそれぞれ添加し、各菌株培養液の各希釈系列の肉試料液を作製した。それぞれの試料液を5μmのフィルターを通し大きな食品くずを取り除いた後、実施例3記載のDNA抽出および実施例5記載のPCR反応を行い、2.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。その結果、肉試料液での病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの検出限界は、いずれも10 3 C F U / m 1 であることを確認した。結果の電気泳動図を図2に示した。

【実施例8】

[0029]

(接種した食品からの病原菌の検出)

病原性大腸菌〇157:H7 ATCC43894、サルモネラ属菌IFO3313、リステリアモノサイトゲネスATCC49594を用いた。豚挽肉に各菌株が10 2 СF U/25g、10CF U/25g、1CF U/25g、10 CF U/25g、10 CF U/25g、10 CF U/25gになるようそれぞれ接種した。接種した豚挽肉25gにNo.17培地を225ml加え、ストマッカーで30秒粉砕し、35℃で24時間培養した。各培養液を5 μ mのフィルターを通すことで大きな食品くずを取り除いた後、実施例3記載のDNA抽出および実施例5記載のPCR反応を行い、2.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。結果を図3に示す。その結果、いずれの菌株も1CF U/25g存在すれば検出できることを確認した。病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスなどの危害の高い病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスなどの危害の高い病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトがネスなどの危害の高い病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトがネスなどの危害の高い病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトがネスなどの危害の高い病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトがネスなどの危害の高い病原菌は、食品中で「陰性」(25g中に含まれていないこと)であることが定められており、その検出には、公定法と同等以上の精度があることが確認された。

【実施例9】

[0030]

(公定法と多重検出法との比較試験; 市販食品からの病原菌の検出)

鶏肉や鶏肝など、20検体をスーパーから購入し、病原性大腸菌O157、サルモネラ 属菌、リステリアモノサイトゲネスの検査を多重検出法により行うとともに公定法と比較 した。また、公定法は、次の通りに行った。

[0031]

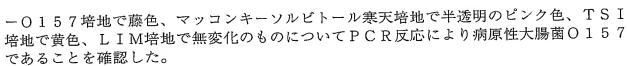
病原性大腸菌 O 1 5 7 については、検体 2 5 g にノボビオシン加m E C ブロス(極東製薬工業社製) 2 2 5 m l を加え、ストマッカーで 3 0 秒粉砕した後、

42℃で18時間培養し、クロモアガー〇157培地(関東化学社製)およびマッコンキーソルビトール寒天培地(日水製薬社製)に画線し、35℃で18

~24時間培養した。クロモアガー〇157培地で藤色、マッコンキーソルビトール培地で半透明のピンク色を示したものを病原性大腸菌〇157擬陽性とし、CLIG寒天培地(極東製薬工業社製)に画線し、35℃で18~24時間培

養した。下層が黄色く、上層がピンクでかつ紫外放射により発光しないものを病原性大腸菌 O 1 5 7 擬陽性とし、インドール反応を行い、陽性(赤)のものについて凝集反応を行った。凝集反応は大腸菌 O 1 5 7 検出キット「UNI」(O x o i d)を用いて行った。凝集反応で疑わしいコロニーをクロモアガーO 1 5 7 培地、マッコンキーソルビトール寒天培地、T S I 培地(日水製薬社製)、L

I M培地(日水製薬社製)に画線し、35℃で24時間培養した。クロモアガ



[0032]

サルモネラ属菌については、検体 25g に EEM ブイヨン(日水製薬社製) 225m 1を加え、ストマッカーで 30 秒粉砕した。 35 ℃で 18 時間培養し、セレナイトシスチン基礎培地(日水製薬社製) 10m 1に 1m 1 加え、 43 ℃ で $15\sim18$ 時間培養した。全体あるいは沈殿が赤色を呈したものについて、 1 白金耳を ML C B 寒天培地(日水製薬社製)に画線し、 35 ℃で 24 時間培養後、黒色のコロニーを生じたものをサルモネラ属菌擬陽性とし、確認試験として、 TSI 寒天培地、 LIM 培地に画線した。 35 ℃、 $24\sim48$ 時間培養し、 TSI 培地で斜面が赤く高層が黒色で、 LIM 培地で無変化のものをサルモネラ属菌陽性とした。 リステリアモノサイトゲネスについては、検体 25g に UVM リステリア選択増菌ブイヨン(Merck社製) 225m 1を加え、ストマッカーで 30 秒粉砕した。 30 ℃で 48 時間培養し、 9 日本に、 9 日本には、 9 日本には、

社製)に画線して、35℃、24~48時間培養した。溶血性が陽性のものについてオキシダーゼ反応、カタラーゼ反応、グラム染色、顕微鏡観察、アピリステリア(日本ビオメリュー社製)を行い、リステリアモノサイトゲネスと同定されたものをリステリアモノサイトゲネス陽性とした。

[0033]

多重検出法については次のように行った。検体 25g に、No. 17 培地を 225m l 加え、ストマッカーで 30 秒粉砕し、 35 \mathbb{C} で 24 時間培養した。培養液を 5μ mのフィルターを通すことで大きな食品くずを取り除いた後、実施例 3 記載の DNA 抽出および実施例 5 記載の PCR 反応を行い、 2.5% アガロースゲル電気泳動により確認した。結果を表 3 に示す。

[0034]

その結果、病原菌が検出した検体は、公定法では病原性大腸菌O1570検体、サルモネラ属菌 3検体、リステリアモノサイトゲネス 6検体、多重検出法では病原性大腸菌O1570検体、サルモネラ属菌 3検体、リステリアモノサイトゲネス 8検体であり、公定法で陽性であった検体はいずれも多重検出法で陽性であった。また、公定法で陰性、多重検出法で陽性であったリステリアモノサイトゲネス2検体(表3、検体No. 5、15)について、No. 17での培養液をPALCAMリステリア選択寒天培地(Merck)に画線培養後、形成したコロニーの同定試験を行ったところ、リステリアモノサイトゲネスであることを確認した。このことから、本多重検出法では公定法に比べて同等以上の精度があることを確認した。

[0035]

【表3】

. 7	サンフ	۶۱۱.	公定法			多重検出法			
No.	mit 7	品名	一般生菌 数 (CFU/g)	0157	サルモ ネラ属 菌	リステ リア	0157	サルモ ネラ属 菌	リステリア
1		赤鶏むね挽肉(国産)	1.7*10 6	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
2		若鶏ささみ挽肉(国産)	3.7*10 7	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
3	A	若どりもも挽肉(国産)	2.3*10 7	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
4		若どり肝(国産)	3.0*10 5	陰性	陰性	陰性		陰性	陰性
5		国産若鶏ささみ挽肉	2.2*10 5	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性。	陽性
6	1	国産若鶏ももこまざれ(解凍)	1.7*10^5	陰性	陽性。	陰性	陰性	常陽性。	陰性
7	В	国産若鶏むね挽肉	4.9*10 4	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
- 8	-	国産若鶏砂肝	6.0*10 5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
		親鶏モツ(国産)	3.6*10 5	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性	
9	4	若鶏皮(国産)	3.4*10 5	陰性	陰性	"陽性"	陰性	陰性	陽性
10	C	岩鶏挽肉 (国産)	4.8*10 6	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
11	4	若鶏ササミ(国産)	1.6*10 5	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
12	+	解凍鶏ハート(国内産)	8.6*10^6	陰性	陰性	·陽性	陰性	陰性	陽性
13	1	解凍器ハート(国内産) 解凍若鶏ひざナンコツ(米国産フレッシュ解凍品)		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
15	D	鶏モモ小間 (チキンライス用 (国内産)	1.4*10^6	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	1. 場性
16	-	岩鶏モモ肉唐揚用(S)(ブラジリ産)	6.8*10^7	陰性	陰性	煤性	陰性	陰性	陽性
1	,	国内産若鶏挽肉	3.8 * 10 6	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	_	国産若鶏筋なしササミ	1.2*10^4	陰性	陰性	意陽性	除性	陰性	"陽性
13	- 1 - 1	国産若鶏小間切れ	2.3*10 5	陰性	陰性	陽性		陰性	陽性
19		国産岩鶏スペアーリブ	2.5*10 6	陰性	陰性	陽性	2 陰性	陰性	小陽性
2	U	四年有機八、八	陽性数	0	3	6	0	3	8

【図面の簡単な説明】

[0036]

【図1】トリプトソーヤブイヨン(TSB)およびBuffered Peptone Water(BPW)培地を用いた35℃培養での病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスおよび一般生菌数の挙動を示す図である。

【図2】病原性大腸菌〇157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌株を接種した肉試料液中(一般生菌数:3.1×10⁸CFU/ml)での各菌株の多重検出法による検出限界を示す電気泳動像の図である。

[0037]

M:分子量マーカー

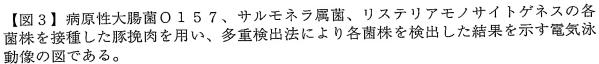
レーン1~7は、病原性大腸菌O157接種区(一般生菌数:3.1×10⁸CFU/m1)を示し、O157接種量は次の通り。

1:1. 1×10^{7} CFU/m1, 2:1. 1×10^{6} CFU/m1, 3:1. 1×10^{5} CFU/m1, 4:1. 1×10^{4} CFU/m1, 5:1. 1×10^{3} CFU/m1, 6:1. 1×10^{2} CFU/m1, 7:11 CFU/m1

レーン8~14は、サルモネラ属菌接種区(一般生菌数:3.1×10 8 CFU/m1)を示し、サルモネラ接種量は次の通り。

8:5. 0×10^6 CFU/ml, 9:5. 0×10^5 CFU/ml, 10:5. 0×10^4 CFU/ml, 11:5. 0×10^3 CFU/ml, 12:5. 0×10^2 CFU/ml, 13:50 CFU/ml, 14:5 CFU/ml

レーン $15\sim21$ は、リステリアモノサイトゲネス接種区(一般生菌数: 3.1×10 8 C F U / m 1)を示し、リステリア接種量は次の通り。



[0038]

M:分子量マーカー

レーン1~4は、リステリアモノサイトゲネス接種区を示し、リステリア接種量は次の 通り。

1:16CFU/25g, 2:1.6CFU/25g, 3:0.16CFU/25g, 4:0.02CFU/25g

レーン5~8は、サルモネラ属菌接種区を示し、サルモネラ属菌接種量は次の通り。

5:110CFU/25g, 6:11CFU/25g, 7:1.1CFU/25g, 8: 0.11CFU/25g

レーン9~12は、病原性大腸菌O157接種区を示し、O157接種量は次の通り。 9:85CFU/25g、10:8.5CFU/25g 、11:0.85CFU/25 g 、12:0.09CFU/25g

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> I	Prima	Meat	Packers,	Ltd.
---------	-------	------	----------	------

- <120> Multiple Detecting Method for Microorganism
- <130> 2003P1920PH
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> primer
- <400> 1
- ggcggattag acttcggcta

20

- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> primer
- <400> 2
- cgttttggca ctatttgccc

20

- <210> 3
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> primer
- <400> 3
- gggagtccag gttgacggaa aattt

25

<210> 4

20



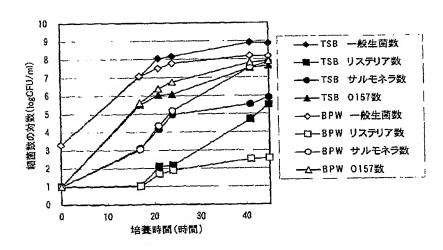
<400> 6

cctccagagt gatcgatgtt

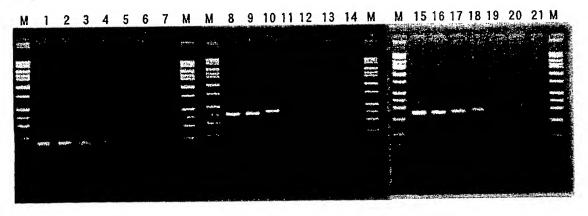
<211> <212> <213>		
<220> <223>	primer	
<400> gtcacg	4 gaag aagagaaatc cgtacg	26
<210><211><211><212><213>	20	
<220> <223>	primer	
<400> cggagg	5 gttcc gcaaaagatg	20
<210> <211> <212> <213>	20	
<220> <223>	primer	



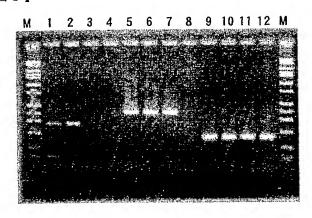
【書類名】図面【図1】



【図2】



【図3】





【書類名】要約書

【要約】

【課題】 食品に存在する病原性大腸菌O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の汚染微生物を、1本の反応チューブ内で同時に、公定法と同等又はそれ以上の高い感度で検出することができる微生物の多重検出方法を提供することにある。

【解決手段】 (A) $1\sim10$ C F U /40 m 1 の微生物が 24 時間培養後に 10^3 C F U / m 1 以上となる培養条件下、例えば培養後の p H が 5. 1 以上となる培養条件下で培養する工程と、(B) 少なくとも、アクロモペプチダーゼ及び/又はリゾチームからなる溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のD N A を抽出する工程と、(C) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックス P C R を行う工程とからなり、食品中の 2 種以上の異なる特性の微生物を、1 本の反応チューブ内で同時に、公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する。



認定・付加情報

特許出願の番号 特願2003-435943

受付番号 50302154585

書類名 特許願

担当官 第五担当上席 0094

作成日 平成16年 1月 5日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000113067

【住所又は居所】 東京都品川区東大井3丁目17番4号

【氏名又は名称】 プリマハム株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 501145295

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12

【氏名又は名称】 独立行政法人食品総合研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100107984

【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】 100102255

【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】 小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100118957

【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】 岡晴子

【選任した代理人】

【識別番号】 100123168

【住所又は居所】 東京都港区赤坂2丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子

【選任した代理人】



【識別番号】

100120086

【住所又は居所】

東京都港区赤坂2丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也



特願2003-435943

出願人履歴情報

識別番号

[000113067]

1. 変更年月日 [変更理由] 住 所

氏 名

2001年 5月16日 住所変更

東京都品川区東大井3丁目17番4号

プリマハム株式会社



特願2003-435943

出願人履歴情報

識別番号

[501407218]

1. 変更年月日

2001年11月27日

[変更理由]

識別番号の二重登録による抹消

[統合先識別番号] 5 0 1 1 4 5 2 9 5

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1番地12

氏 名

独立行政法人食品総合研究所



特願2003-435943

出願人履歴情報

識別番号

[501145295]

1. 変更年月日

2001年11月27日

[変更理由]

識別番号の二重登録による統合

[統合元識別番号] 5 0 1 4 0 7 2 1 8

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1番地12

氏 名

独立行政法人食品総合研究所